

学校编码: 10384  
学号: 21620071152025

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_  
UDC\_\_\_\_\_

厦门大学

硕士 学位论文

# 醛糖还原酶与胰岛素抵抗: 抑制醛糖还原酶对 脂肪组织炎症反应及肝脏 AMPK 活性的影响

**Aldose Reductase and Insulin Resistance: Effects of Inhibition  
of Aldose Reductase on Inflammation in the Adipose Tissue and  
AMPK Activity in the Liver**

张翠林

指导教师姓名: 杨云青 教授 博导

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2010 年 月

论文答辩时间: 2010 年 月

学位授予日期: 2010 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2010 年 月

厦门大学博硕士论文摘要库

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

# 目录

摘要.....	1
Abstract.....	3
缩略语对照表.....	5
第一章 前言.....	7
1. II型糖尿病与胰岛素抵抗.....	7
2. 脂肪组织、炎症及胰岛素抵抗.....	12
3. AMPK 与胰岛素抵抗.....	18
4. AR 的生物学功能及其与炎症的关系.....	21
5. 本研究的目的、内容和意义.....	24
第二章 材料与方法.....	26
1. 实验材料.....	26
2. 实验方法.....	32
第三章 结果与分析.....	41
1. AR 的缺失显著改善了 C57BL/6 A <sup>y/a</sup> 小鼠的脂质代谢和葡萄糖耐受性.....	41
2. 靶向 AR 的 pLL3.7-neo-AR 慢病毒构建.....	43
3. AR 与脂肪组织中的炎症反应.....	45
(a) 巨噬细胞 RAW264.7 中的 AR knock-down 实验.....	45
(b) 在巨噬细胞 RAW264.7 利用 ARI 处理抑制 AR 显著降低了 TNF $\alpha$ 和 IL-6 的表达, 但对 MCP-1 没显著影响.....	47
(c) 在前脂肪细胞 3T3-L1 细胞利用 ARI 处理抑制 AR 显著降低了 MCP-1、TNF $\alpha$ 和 IL-6 的表达.....	48
(d) ARI 腹腔注射抑制 db/db 小鼠肝脏及脂肪组织脂质聚积.....	49
(e) ARI 处理抑制 M1 型巨噬细胞对脂肪组织的浸润.....	52
(f) AR 的遗传缺失也可以改善 db/db 小鼠的炎症状态.....	54
4. AR 对肝组织 AMPK 的影响.....	58
(a) 肝细胞系 AML12 中的 AR knock-down.....	58
(b) ARI 处理显著提高了 db/db 小鼠肝脏 AMPK 的磷酸化.....	60
(c) ARI 部分遗传缺失显著提高了 db/db 小鼠肝脏 AMPK 的磷酸化.....	60

第四章 讨论.....	62
参考文献.....	67
致谢.....	80

厦门大学博硕士论文摘要库

## Table of Content

Abstract in Chinese .....	1
Abstract in English.....	3
Abbreviations.....	5
Chapter I Introduction .....	7
1. Type II diabetes and insulin resistance .....	7
2. Adipose tissue, inflammation and insulin resistance .....	12
3. AMPK and insulin resistance.....	18
4. Physiological function of AR and inflammation .....	21
5. Experimental hypothesis and goals.....	24
Chapter II Materials and Methods .....	26
1. Materials .....	26
2. Methods.....	32
Chapter III Results and Analysis.....	41
1. AR deficiency significantly improves lipid metabolism and glucose tolerance in C57BL/6 <i>A<sup>y</sup>/a</i> mice .....	41
2. Lentiviral AR-shRNA plasmid construction .....	43
3. AR and inflammation in adipose tissue .....	45
(a) AR knock-down experiments in RAW265.7 .....	45
(b) ARI treatment significantly inhibits TNF $\alpha$ and IL-6 mRNA expression while has no influence on MCP-1 in RAW264.7 cells.....	47
(c) ARI treatment significantly inhibits MCP-1, TNF $\alpha$ and IL-6 mRNA expression level in 3T3-L1 cells .....	48
(d) Inhibition of AR by ARI reduces lipid accumulation in db/db mice...	49
(e) Inhibition of AR by ARI inhibits macrophage infiltration in adipose tissue .....	52
(f) AR knock-out inhibits macrophage infiltration in adipose tissue .....	54
4. AR controls AMPK activity in liver .....	58
(a) AR knock-down experiments in AML12.....	58

(b) Inhibition of AR by ARI up-regulates AMPK activity in the liver ....	60
(c) AR knock-out up-regulates AMPK activity in the liver .....	60
Chapter IV Discussion .....	62
References.....	67
Acknowledgement .....	80



## 摘要

醛糖还原酶（AR）在细胞代谢、免疫/炎症应答、渗透调控、细胞解毒、激素合成、生殖发育与代谢调控等生命活动中扮演着重要角色。我们实验室在前期研究中发现，AR 可通过调节 MAPK-ERK 信号通路来改变肝代谢性核受体 PPAR $\alpha$  的磷酸化和活性，进而影响细胞内脂质稳态。我们的预实验还显示，AR 的缺失显著地改善了 C57BL/6  $A^y/a$  小鼠的脂质代谢和葡萄糖耐受性，提示 AR 活性的异常可能与胰岛素抵抗的发生发展有关。

本研究中，我们分别通过利用慢病毒 AR-shRNA 系统、醛糖还原酶抑制剂（aldose reductase inhibitor, ARI）zopolrestate 处理的细胞模型以及 ARI 处理的动物模型和 AR 缺失的基因敲除小鼠模型，研究了 AR 活性的改变对巨噬细胞与脂肪组织炎症发生和肝脏 AMPK 活性的影响，进而探讨了 AR 在胰岛素抵抗中的作用。

在巨噬细胞系 RAW264.7 中我们研究了抑制 AR 对炎症因子 TNF $\alpha$  及 IL-6 表达的影响。结果显示，无论是慢病毒 shRNA 介导的 AR knock-down 还是 ARI 介导的 AR 抑制都显著降低了巨噬细胞炎症因子 TNF $\alpha$  及 IL-6 的表达，表明 AR 的抑制可以降低巨噬细胞的免疫活性。

我们选取了 4 周龄的 db/db 糖尿病小鼠并以 50 mg/kg 的剂量进行了为期 4 周的 ARI 腹腔注射，发现 ARI 处理能显著抑制 db/db 小鼠体重的增长及血糖的上升，但是对小鼠食欲基本上没有影响。与对照组对比，ARI 处理 db/db 小鼠的肝脏及附睾脂肪变化最为明显，肝脏和附睾脂肪的重量显著低于对照组；而冰冻切片油红染色及试剂盒 TG 测定等实验证明 ARI 处理的 db/db 小鼠肝脏脂质含量显著降低。通过 Real-time PCR 及组织学方法，我们对脂肪组织的巨噬细胞浸润程度进行了评估，发现 ARI 处理能够显著降低 db/db 小鼠脂肪组织中巨噬细胞浸润数量及炎症因子的表达量。

我们将实验室维持的 AR 敲除（AR<sup>-/-</sup>）小鼠与 db/m 小鼠进行了杂交，获得了 db/db-AR<sup>+/-</sup>及 db/db-AR<sup>+/+</sup>小鼠。利用这些小鼠的研究结果显示，与 ARI 药物处理的结果一致，AR 的部分缺失抑制了巨噬细胞对脂肪组织的浸润，同时降

低了炎症因子的表达。

利用慢病毒 shRNA 系统，我们研究了 AR 对肝 AML12 细胞 AMPK 活性的影响。结果显示，AR knock-down 后肝 AML12 细胞中 AMPK $\alpha$  的磷酸化水平得到显著提高，而 AMPK $\alpha$  本身蛋白量没有明显变化。与此一致，在 ARI 处理的 db/db 小鼠中，AR 的抑制也不改变 AMPK $\alpha$  蛋白表达量，但显著地提高了肝脏中 AMPK $\alpha$  的磷酸化水平。这些实验结果也在 db/db-AR<sup>+/-</sup>及 db/db-AR<sup>+/+</sup>小鼠中得到了进一步证实。这些结果说明，抑制 AR 能够显著提高肝细胞中 AMPK 的活性，影响肝脏的脂质代谢。

综上所述，抑制 AR 显著降低脂肪组织的炎症浸润并激活了肝脏 AMPK。由于脂肪组织的炎症浸润和肝脏 AMPK 的活性与胰岛素抗性的发生发展密切相关，AR 活性的异常调控可能在胰岛素抵抗的发生发展中有重要的作用。抑制 AR 可能对改善胰岛素抵抗是有益的。

**关键词：**醛糖还原酶，慢性炎症，AMPK

## Abstract

Aldose reductase (AR) plays a key role in inflammatory response, osmotic regulation, cellular detoxification, hormone synthesis, propagation and metabolic regulation. In our previous studies, we had shown that AR regulates PPAR $\alpha$  phosphorylation and activity through MAPK-ERK pathway, thereby affecting cellular lipid metabolism. Our preliminary study also showed in C57BL/6 *A<sup>y/a</sup>* mice that AR deficiency could be beneficial for lipid metabolism and glucose tolerance. These results suggest that abnormal AR activity might be associated with insulin resistance.

Here, we explored the effect of AR inhibition on chronic inflammation and AMPK activity both in vivo and in vitro by using lentivirus or ARI treatment in cell lines and ARI injection or AR knock-out in db/db mice.

We measured mRNA expression level of several inflammatory factors in macrophage cell line RAW264.7 after AR inhibition or ablation. We show here that either ARI treatment or AR ablation can decrease the expression level of inflammatory factors, such as MCP-1, TNF $\alpha$  and IL-6, thus reducing the immune activity of macrophage.

We used 4-week old db/db mice for intraperitoneal injections with saline or 50 mg/kg zopolrestat (one of the most popularly used AR inhibitor), and closely inspected on the physiological signs such as body weight and blood glucose. Interestingly, we found out that ARI treatment significantly decreased the growth in weight and blood glucose while had no influence on the appetite of the mice. When compared with the saline injected mice, the weights of liver and epididymal adipose tissue were significantly decreased in ARI treated mice. Meanwhile, the lipid content in the liver was greatly reduced in ARI-treated mice as assayed by oil red O stain to the frozen section and TG content measurement. Further research on inflammation status in adipose tissue by Real-time PCR and histological method indicated that ARI can strongly inhibit macrophage recruitment into the epididymal adipose tissue and inhibit the expression of inflammatory factors.

We bred the aldose reductase knockout (KO, AR<sup>-/-</sup>) mice with the db/m mice, and acquired two genotype groups of mice, which were designated db/db-AR<sup>+/-</sup> and db/db-AR<sup>+/+</sup> respectively. Consistent with the results from the ARI-treated db/db mice, we found out that AR knockout inhibited both macrophage infiltration and inflammatory factors expression in the epididymal adipose tissue.

Using a lentivirus shRNA system, we also studied the effect of AR inhibition on the activity of AMPK in AML12 cells. Significantly AR inhibition caused no change in AMPK $\alpha$  protein level but greatly increased its phosphorylation (Thr172). Consistent with this, AR inhibition in db/db mice by ARI significantly up-regulated phosphorylated AMPK $\alpha$  in the liver while total AMPK $\alpha$  remained unchanged. This later result was further validated in AR knock-out db/db mice.

Chronic inflammation and reduced AMPK activity both contribute to the development of insulin resistance. Our results therefore suggest that AR might be involved in the development of insulin resistance by contributing to regulation of inflammation in the adipose tissue and the activity of AMPK in the liver. Further, AR inhibition potentially might be beneficial for improving insulin insensitivity in the mammals.

**Key words:** Aldose reductase, inflammation, AMPK

## 缩略语对照表

缩略语	英文	中文
ARI	aldose reductase inhibitor	醛糖还原酶抑制剂
AR	aldose reductase	醛糖还原酶
SDH	sorbitol dehydrogenase	山梨醇脱氢酶
M1	classically activated macrophage	经典激活型巨噬细胞
M2	alternatively activated macrophages	另类激活型巨噬细胞
TG	triglyceride	甘油三酯
FFA	free fatty acid	游离脂肪酸
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1	单核细胞趋化蛋白-1
IL-18	interleukin 18	白介素-18
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$	肿瘤坏死因子 $\alpha$
IL-6	interleukin 6	白介素-6
IRS	insulin receptor substrate proteins	胰岛素受体蛋白
LPS	lipopolysaccharides	脂多糖
TLR4	Toll-like receptor 4	TLR 受体 4
PTP1B	phosphotyrosine phosphatase 1B	蛋白酪氨酸磷酸酶 1B
SOCS	suppressor of cytokine signaling	细胞因子信号抑制子
JNK	c-Jun N-terminal Kinase	JNK
DAG	diacylglycerol	二脂酰甘油
iNOS	inducible nitric oxide synthase	诱导型一氧化氮合酶
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa B	细胞核因子- $\kappa$ B
PKC	protein kinase C	蛋白激酶 C
IKK	I $\kappa$ B kinase	I $\kappa$ B 激酶
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	趋化因子配体 2
AMPK	AMP-activated protein kinase	AMP 激活蛋白激酶
LKB1	serine/threonine kinase 11	LKB1

PGC1	PPAR $\gamma$ co-activator 1	PPAR $\gamma$ 共激活因子 1
GLUT4	glucose transporter type 4	第四型葡萄糖转运子
MEF-2	myocyte enhancer factor-2	肌细胞增强因子
ACC	acetyl-CoA carboxylase	乙酰辅酶 A 羧化酶
MAPK	mitogen-activated protein kinase	有丝分裂原激活蛋白激酶
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor	过氧化物酶体增殖激活受体
PEPCK	phosphoenolpyruvate carboxykinase	磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶
G6Pase	glucokinase	葡萄糖激酶
AGE	advanced glycation end-product	糖基化终产物
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
CPT-1	carnitine palmitoyltransferase-1	肉碱棕榈酰转运酶-1
RNAi	RNA interference	RNA 干扰
shRNA	small hairpin RNA	小发夹 RNA

## 第一章 前言

### 1. II型糖尿病与胰岛素抵抗

#### 1.1 II型糖尿病流行病学趋势

在现代社会，糖尿病业已成为一种流行病，全世界有超过1.7亿人口患有这种疾病。相比于2005年，2010年全球糖尿病人增加了50%，这种增长趋势在亚非拉美等发展中国家尤其突出<sup>[1,2]</sup>。在我国，人口老龄化和居民生活方式的改变导致糖尿病患病率呈现明显的上升趋势，使得我国成为仅次于印度的糖尿病第二大国。

由中华医学会糖尿病学分会最新完成的中国糖尿病流行病学调查显示：目前，在我国城镇人口中，糖尿病患者大概有4100万人，比国际糖尿病联盟2003年推算出的3980万人多出100余万人。另外，在对全国14个省市的近5万人调查后发现，在20岁—70岁的人群中，男性糖尿病发病率已达12%，比女性和总人口的发病率均高出约2%。糖尿病发病率快速上升且有年轻化趋势，而由糖尿病伴随的综合症所引起的医疗及经济问题给社会及个人带来了沉重负担。据统计，大约90%的糖尿病患者患有II型糖尿病综合症，而其中绝大多数病症都是受多因素影响的，发病机制非常复杂<sup>[3]</sup>。因此，对II型糖尿病的研究就显得格外迫切。

#### 1.2 胰岛素抵抗简介

近年来通过临床流行病学研究、遗传流行病学研究、干预试验前瞻性研究等方法观察胰岛素抵抗的非糖尿病者糖尿病的发病情况，结果证明胰岛素抵抗在II型糖尿病发病中起重要作用，并贯穿于II型糖尿病全过程。胰岛素抵抗（insulin resistance, IR）是指正常浓度的胰岛素的生理效应低于正常水平，主要表现为胰岛素抑制肝释放葡萄糖的能力及促进外周组织（主要在骨骼肌）利用葡萄糖的能力下降，为了调节血糖在正常水平，机体代偿性分泌过多胰岛素，产生高胰岛素血症，从而引发机体一系列病理生理变化，最终导致各种代谢疾病的发生和发展。胰岛素抵抗是多种疾病如II型糖尿病、肥胖、高血压、高脂血症、冠心病的共同发病基础。

以下将对导致胰岛素抵抗的原因进行概述。

### 1.2.1 肥胖

胰岛素抵抗是与肥胖及运动缺乏密切相关的。源自脂肪细胞的一系列激素、细胞因子和游离脂肪酸（free fatty acid, FFA）等能够进入到血液当中调节胰岛素的作用。在肥胖状态下，随着大量TG在内脏和皮下等部位脂肪组织中的储存，能够使得脂肪细胞肥大并产生胰岛素抵抗，从而导致持续的脂解。这样失控的脂质分解会导致FFA和甘油的过量释放进入循环系统，加剧肌肉组织和肝脏的胰岛素抵抗<sup>[4]</sup>。

过量的脂质不仅仅会储存在脂肪细胞中，而且会在非脂肪细胞中产生异位储存，而这样的异位存储在胰岛素抵抗中也有着重要作用<sup>[5]</sup>。比如在某些情况下，肌肉细胞中脂质储存的增加是与肌肉组织的胰岛素抵抗直接相关的<sup>[6]</sup>。而在肝脏中，肝细胞的脂质储存与胰岛素抵抗二者之间的联系就更为紧密了<sup>[7, 8]</sup>。

### 1.2.2 胰岛素信号传导的异常调控

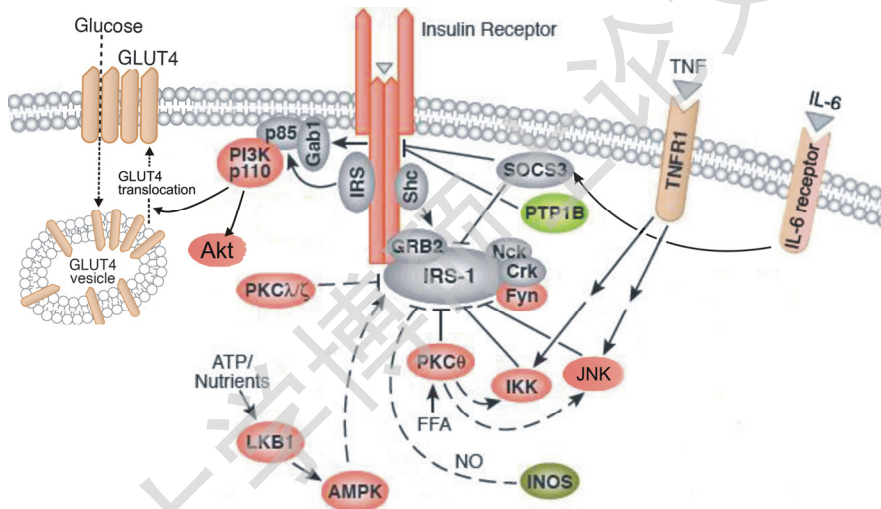


图 1：胰岛素信号通路，主要参考 cell signal 公司网站 (<http://www.cellsignal.com/pathways/glucose-metabolism.jsp>)。

Fig. 1 Insulin signaling pathway.

胰岛素是通过结合并激活细胞膜上一个特定的具有酪氨酸激酶活性的受体来行使其多效性的代谢功能的<sup>[9]</sup>。胰岛素受体激酶的蛋白底物——绝大多数都属于IRS蛋白（insulin receptor substrate proteins），会在许多酪氨酸位点上被有效地



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库